云 南 植 物 研 究 1999，21 (2)：144~148
Acta Botanica Yunnanica

竹柏类植物的RAPD分析*

王 艇[1] 苏应娟[1] 黄 超[2] 朱建明[1]
([1] 中山大学生命科学学院，广州 510275)
([2] 湖北中医学院药学系，武汉 430061)

摘要 对鸡毛松（*Podocarpus imbricatus*）、竹柏（*Podocarpus nagi*）、长叶竹柏（*Podocarpus fleuryi*）、百日青（*Podocarpus neriifolius*）和罗汉松（*Podocarpus macrophyllus*）进行了RAPD分析。经筛选4组80个引物，发现9个引物的带型清晰并呈多态性。采用UPGMA法对求出的遗传距离进行聚类分析，得到的结果显示：本研究中的植物明显地分为3个亚类群，支持在罗汉松属内建立竹柏组的处理方式，不同意把竹柏类从罗汉松属中分离出去成立新科的观点。

关键词 竹柏类，RAPD分析
分类号 Q 943

RAPD Analyses of *Nageiaoids*

WANG Ting[1], SU Ying-Juan[1], HUANG Chao[2], ZHU Jian-Ming[1]
([1] *School of Life Sciences, Zhongshan University*, Guangzhou 510275)
([2] *Department of Pharmacy, Hubei Chinese Traditional Medicine College*, Wuhan 430061)

Abstract Choosing *Podocarpus imbricatus*, *Podocarpus nagi*, *Podocarpus fleuryi*, *Podocarpus neriifolius* and *Podocarpus macrophyllus* are analysed through the RAPD techniques. Eighty primers from 4 operon kits were screened and 9 of them were able to produce clear polymorphic patterns. The results generated by using UPGMA algorithm to cluster genetic distances calculated from RAPD data imply: 1) the studied species are apparently clustered into three subgroups, which supports the treatment of constructing corresponding sections, Sect. Dacrycarpus, Sect. Nageia and Sect. Podocarpus in the genus *Podocarpus*, 2) it is unreasonable to separate nageiaoids from *Podocarpus* and to establish a new family named Nageiaceae.

Key words Nageiaoids, RAPD analyses

竹柏类植物是裸子植物中引人注目的类群，其木材纹理直，结构细而均匀，易加工，经久耐用，为高级建筑、家具的首选材，也是庭院绿化树种。但是有关竹柏类植物的系统发育分类地位目前仍然存在争论。本文通过对竹柏类及罗汉松科其他植物进行RAPD分析，以期为进一步探讨竹柏类植物的系统位置提供分子依据。

* 国家自然科学基金资助项目（39500013，39700117）、广东省自然科学基金资助项目（950099，970176）
1998-09-24收稿，1999-02-01接受发表

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验材料见表 1。每种植物选择摘取 3 个个体的叶片。

表 1 材料名称及来源

Table 1 Plant material and their origin

植物名称 Plant name	来源 Origin
鸡毛松（*Podocarpus imbricatus*）	Campus of Zhongshan University
竹柏（*Podocarpus nagi*）	Campus of Zhongshan University
长叶竹柏（*Podocarpus fleuryi*）	South – China Botanic Gardens
百日青（*Podocarpus neriifolius*）	South – China Botanic Gardens
罗汉松（*Podocarpus macrophyllus*）	Campus of Zhongshan University, South – China Botanic Gardens

1.2 主要试剂

10 mer 寡核苷酸随机引物购自 Operon 公司（A 组、C 组、D 组、E 组）。RAPD 试剂盒购自北京通康生物技术有限责任公司。分子量标记购自中山大学生物工程研究中心真核分子生物学实验室。其余试剂为国产分析纯试剂。

DNA 的提取与浓度、纯度检测　取 0.5 g 植物新鲜叶片，在液氮中迅速研磨成粉末，分装于 4 个 1.5 mL 的 Eppendorf 管中，每管加 1 mL －20℃丙酮轻轻振荡 1 min，5000 r/min 离心 10 min，弃上清，重复一次。每管加入 60℃预热 CTAB 提取液 1 mL，充分混匀，60℃保温 4 h，500 μL 氯仿:异戊醇（24:1）抽提 10 min，13000 r/min 离心 10 min，重复一次。取水相，加入 2/3 体积冷异丙醇，轻轻混合，可见絮状沉淀，2000 ~ 3000 r/min 离心 3 min，弃上清液取沉淀。每管加入 800 μL 清洗液，室温下作用 20 min，1000 r/min 离心 10 min，弃上清，自然凉干。用 70 μL TE 溶解。1.4% 琼脂糖凝胶（加溴乙锭至 0.5 μg/mL）、100V 电泳 30 min，紫外灯下观察照相。752 型分光光度计上，波长 260 nm 及 280 nm 处测定吸光度值，根据 A_{260}/A_{280} 比值判断 DNA 样品的纯度，由 A_{260} 的值估算浓度。

1.3 RAPD 分析

扩增反应在 ERICOMP 公司 PCR 仪上进行。反应体积 25 μL，包括 H_2O 16.5μL，PCR 缓冲液 2.5μL，dNTP 1 μL，引物 1 μL，模板 2 μL（50 ~ 160 μg），Taq 酶 2 μL（1.5U），反应混合物用 20 μL 石蜡油覆盖。扩增条件：95℃预变性 200 s；94℃变性 1 min，36℃复性 1 min，72℃延伸 2 min，40 个循环；72℃延伸 10 min。每次扩增反应均设置不含 DNA 模板的空白对照。RAPD 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳（加溴乙锭至 0.5 μg/mL）分离，于紫外灯下观察照相。

1.4 数据处理

任意 2 个样本间的遗传距离（D）根据以下公式计算：

$$D = 1 - F,$$

$$F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y),$$

其中 N_X、N_Y 分别是样本 X、样本 Y 扩增出的 DNA 片段总数，N_{XY} 是样本 X 和样本 Y 共有的 DNA 片段数。

根据遗传距离采用 UPGMA（unweighted pair group method with arithmetic mean）法进行聚类分析，构建树系图。

2 结果与讨论

对 Operon 公司的4组80个引物（A1－20，C1－20，D1－20，E1－20）进行筛选，其中9个引物（表2）的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳能得到分离良好并呈多态性的带型（图1）。该9个引物的 G＋C％含量为60％～70％，每个引物扩增的 DNA 片段数为1～11个，它们在每个样本中获得的 DNA 片段总数平均为31个，这些 DNA 片段的分子量范围在370～3900 bp 之间．选择清晰而且重复性好的谱带作为分子数据进一步分析。

根据任意2个样本 RAPD 图谱中共有的 DNA 片段数和扩增出的 DNA 片段总数，可以求出它们之间的遗传距离（表1）。应用 UPGMA 法对遗传距离进行聚类分析得到树系图（图2）。

表1 任意2种植物间的遗传距离，RAPD 图谱中共有的片段数和扩增片段总数

Table 1 Genetic distances between any two species (above diaganol), the numbers of the shared fragments and the total numbers of fragments amplified in RAPD patterns (below diaganol)

	1	2	3	4	5	6
1		0.0693	0.3263	0.3725	0.3469	0.5862
2	94/101		0.2473	0.4200	0.3542	0.5529
3	64/95	70/93		0.3895	0.4066	0.4500
4	64/102	58/100	58/95		0.1633	0.5172
5	64/98	62/96	54/91	82/98		0.5181
6	36/87	38/85	44/80	42/87	40/83	

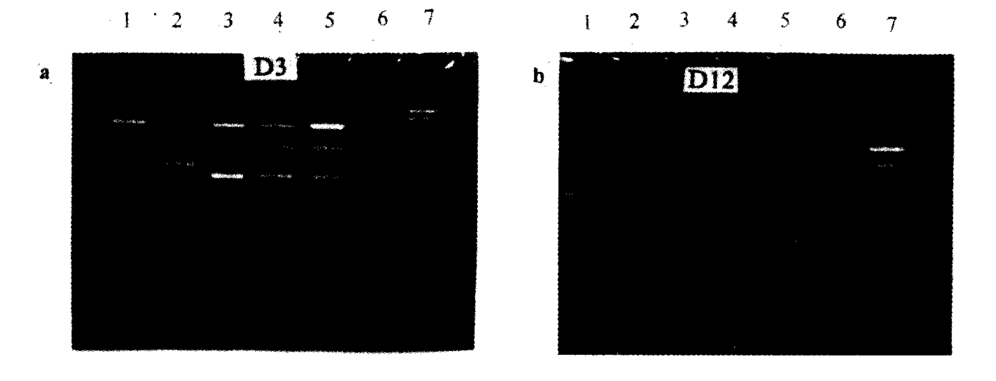


图1 随机引物 D－03（a），D－12（b）扩增产物

1，2. 罗汉松；3. 百日清；4. 竹柏；5. 长叶竹柏；6. 鸡毛松；7. 2kb marker

Fig. 1 Amplification products of primer D－03 (a), D－12 (b)

1, 2. *P. macrophyllus*; 3. *P. neriifolius*; 4. *P. nagi*; 5. *P. fleuryi*; 6. *P. imbricatus*; 7. 2kb marker

表 2　引物名称、碱基序列和扩增后每种植物产生的带型数

Table 2　Name of primers, their base sequences and number of bands generated from each species (1-5) after amplification

名称 Name	序列 Sequence	植物材料 * Plant materials * 1	2	3	4	5	6	总计
OPC-08	5' -TGGACCGGTG-3'	4	3	2	5	5	5	15
OPD-03	5' -GTCGCCGTCA-3'	10	9	9	9	10	11	5
OPD-05	5' -TGAGCGGACA-3'	6	7	6	5	5	5	9
OPD-08	5' -GTGTGCCCCA-3'	5	4	2	3	3	3	5
OPD-10	5' -GGTCTACACC-3'	5	5	4	7	6	3	8
OPD-12	5' -CACCGTATCC-3'	6	7	7	5	5	1	13
OPD-13	5' -GGGGTGACGA-3'	6	7	6	5	4	3	10
OPD-20	5' -ACCCGGTCAC-3'	7	6	7	10	7	6	14
OPE-02	5' -GGTGCGGCAA-3'	2	2	1	2	2	1	2

* 植物材料中的 1、2. 罗汉松，3. 百日青，4. 竹柏，5. 长叶竹柏，6. 鸡毛松

* 1, 2- *P. macrophyllus*; 3- *P. neriifolius*; 4- *P. nagi*; 5- *P. fleuryi*; 6- *P. imbricatus*

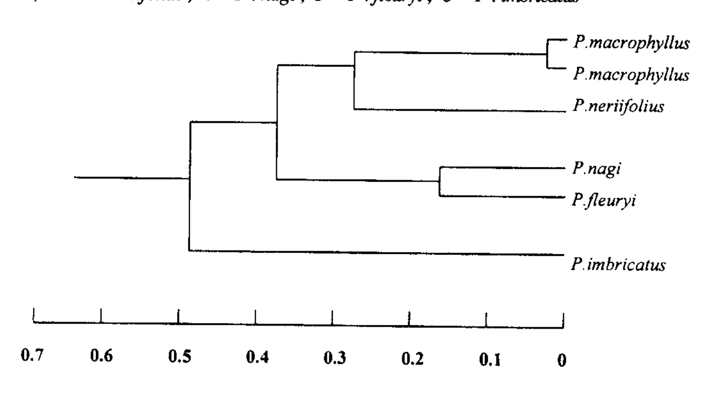


图 2　根据 RAPD 数据，应用 UPGMA 法构建的树系图

Fig.2　Dendrogram generated using UPGMA algorithm to cluster RAPD data

在表 1 中样本 1、2 均为罗汉松，其中样本 1 采自中山大学校园，样本 2 采自华南植物园，它们之间的遗传距离仅为 0.0693。竹柏—长叶竹柏之间为 0.1633。图 2 显示竹柏类植物明显地在罗汉松属内，而且罗汉松属的植物明显地可以进一步分为 3 个亚类群：1）罗汉松和百日青，2）竹柏和长叶竹柏，3）鸡毛松。在亚类群内遗传距离介于 0.1633—0.3263 之间；而亚类群间的遗传距离最小为 0.3469，最高达 0.5862。

在早期研究时曾把竹柏类植物作为裸子植物中的新属 *Nageia*（Stiler，1912）。De Laubenfels（1969）修订罗汉松科时，把竹柏类重新独立为属并且命名属名为 *Decussocarpus* De Laubenfels。他再次修订时恢复使用 *Nageia* 属名而把 *Decussocarpus* 作为该属的新异名（1987）。Page（1988）确认 *Nageia* 属名的合法性，认为该属的主要特征为具独特的宽大多脉叶和分枝的生殖器官构造，并指出该属为极自然的类群。郑万钧、傅立国在《中国植物志》中将竹柏类植物置于罗汉松科（Podocarpaceae）罗汉松属（*Podocarpus*）的竹柏组（Sect. Nageia）内。傅德志（1992）根据叶无中脉而具多数近平行细脉和雌性生殖器官接近原始的枝条状结构，把竹柏属从罗汉松科中分离出来建立单属新科竹柏科（Nageiaceae

D. Z. Fu)。RAPD分析结果（表1，图2）显示罗汉松属植物自然地分为3个亚类群，竹柏类植物为其中一个组，因此竹柏类植物应保留在罗汉松属内，这和郑万钧根据经典分类学提出的罗汉松属处理方式极为吻合（郑万钧等，1978)。假种皮超微结构特征的观察结果也支持这种意见（苏应娟等，1997)。

参考文献

苏应娟，王艇，张宏达，1997. 部分裸子植物假种皮微形态特征及分类学意义 . 西北植物学报，**17**（3)：392～398

郑万钧，傅立国，1978. 中国植物志第七卷 . 北京：科学出版社 .

傅德志，1992. 裸子植物一新科—竹柏科 . 植物分类学报，**30**（6)：515～528

Laubenfels D J de，1969. A revision of the malesian and pacific rainforest conifers，I. Podocarpaceae，in part. Journ. *Arn Arb*，**50**：274～361

Laubenfels D J de，1987. Revision of the genus *Nageia*（Podocarpaceae）. *Blumea*，**32**：209～211

Page C N，1988. New and maintained genera in the conifer families. *Not Roy Bot Gard Edinb*，**45**（2)：337～395

Stiler W，1912. The Podocarpaceae. *Ann Bot*，**26**：443～514